

大豆 - コングリシニンの分子構造と食品機能発現に関する研究

著者	岩淵 せつ子
号	318
発行年	1986
URL	http://hdl.handle.net/10097/17090

氏 名(本籍) いわ 岩 ぶち 淵 せ つ こ

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 318 号

学位授与年月日 昭和 62 年 3 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 大豆 β -コングリシニンの分子構造と
食品機能発現に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 山 内 文 男 教授 藤 本 健 四 郎

助教授 大 久 保 一 良

論 文 内 容 要 旨

序 論

人間が自然界の生産物を人間にとって都合の良いように改変した例として加工デンプンやマーガリンがあるが、タンパク質でこのような例はない。最近のタンパク質工学の新技术により、アミノ酸配列を自由に変えることができるようになり、タンパク質固有の機能性を人為的に変換できる可能性が現実のものとなった。しかし、食品タンパク質の一次構造と機能性との相関は全く分かっておらず、たとえタンパク質工学の手法でアミノ酸配列を変えることができたとしても、その変化がどのような機能を生み出すかを予測することは不可能である。このような視点から大豆タンパク質を眺めると、分子構造と物性発現との間にある相関を、一つづつ明らかにすることが急務と思われる。

大豆タンパク質は種々の機能性を持っているが、それらは未変性では発現されず、大抵加熱によって発現されることが多い。しかし、加熱で生じる濁度が原因となり、大豆タンパク質の熱変性状態に関する情報は今日まで殆んど得られていない状況である。筆者は、ある条件で、 β -コングリシニンが加熱後も全く濁らない性質を持つことを見出した。 β -コングリシニンのこの特質は、大豆タンパク質の加熱変性研究に始めて分光学的手段の導入を可能にしたことを意味している。そこで本研究では β -コングリシニンのこの特徴を利用して、加熱変性時の構造状態を二次構造、三次構造、四次構造のレベルから解明することを目的とした。得られた知見をもとに、物性発現との相関についても考察した。

第 I 章 大豆タンパク質画分に含まれるグリシニン・ β -コングリシニン量の再評価

大豆の全タンパク質に占める二大グロブリン（グリシニン又は11S、 β -コングリシニン又は7S）の割合は70~80%に達すると報告されていた。分画精製の途上で得られるタンパク質画分の組成を免疫的に定量した結果、これまでの定量値とは異なった結果が得られた（Fig. 1）。pH 4.8で沈殿する画分（APPと粗7S）の純度が予想外に悪く、全抽出物（WBE）のタンパク質組成と大差ないほど大量の残余を含む点が注目された。従来の研究の中にはタンパク質の純度を考慮していない報告も見受けられるが、分子構造や相互作用の研究には精製した試料を用いるべきであることを指摘した。

第 II 章 グリシニンと β -コングリシニンの加熱による解離・会合反応に及ぼすイオン強度の影響

大豆タンパク質の加熱変性に及ぼすイオン強度の影響について、精製したグリシニン（Gyと略す）と β -コングリシニン（ β -Cgyと略す）を用いて検討した。100℃ 5分加熱した時の

変性状態を四次構造変化の面から解析した。変性研究の手段として免疫的手法を用い、未変性の Gy と β -Cgy から作成した抗血清に対する反応性を追跡することにより変性曲線を作成した (Fig. 2 と Fig. 3)。同時に濁度曲線も作成した (Fig. 4)。濁度測定と電気泳動分析の結果を合せて以下の点が明らかになった。Gy と β -Cgy 共、低イオン強度下では解離反応が優勢であったが、イオン強度の増加に伴ないサブユニットの会合化が促進された。さらに高イオン強度になると加熱解離に対し、抵抗するようになり、四次構造を保持したタンパク質分子が出現し始めた。

第Ⅲ章 β -コングリシニンの加熱による解離反応について

一般に、タンパク質は加熱で不可逆的に凝集し、定量的な追求が困難と言われ、加熱変性に関する研究は他と比べて遅れていた。第Ⅱ章で、 β -Cgy が $l=0$ のもとでは加熱後も全く濁らないことを見出した。 β -Cgy の蒸留水溶液 (0.5%, pH 7.5) を 65°C で 1-20 分加熱した試料を Sepharose CL-6B でゲルろ過したところ、未変性 β -Cgy (Fig. 5, ピーク 1) の山が経時的に減少し、20 分後には単量体ピーク (Fig. 5, ピーク 2) に完全に転移していた。

β -Cgy の解離反応を分子内部から露出するチロシン (Tyr) を定量することにより追跡し解離曲線を作成した。さらに、これらのデータを速度論的に解析した。Fig. 6 に加熱後冷却した場合の β -Cgy の解離曲線を、Fig. 7 に高温下における構造変化を直接に分光学的に観察することによって得られた変性曲線を示した。Fig. 6 と Fig. 7 から求められるチロシンの最大露出数に大差が生じたが、この差は、前者が加熱で β -Cgy 分子に解離とアンホールディングの構造変化が起きているが、その後冷却により再びホールディングした構造を測定していたのに対し、後者は高温下にある β -Cgy 分子の構造状態を測定していることの相違に起因する。Fig. 6 と Fig. 7 の結果は、一次反応の機構で説明できたので、一次式でプロットし速度定数 ($k_{\text{sec}^{-1}}$) を、次にアレニウスの式から活性化エネルギー (E_a) を求めた (Fig. 8)。 β -Cgy の熱変性は比較的低エネルギーで起ることが分かった。

第Ⅳ章 加熱解離体から β -コングリシニン四次構造の再構成

加熱で解離した単量体 (3.4 S) が、外から加えられる塩によって四次構造を復元し、元の β -Cgy (7S) を再構成することを見出した。Native 系電気泳動で $R_m = 0.65$ の位置に移動した解離体成分は、塩濃度に比例して次第に消失し、代って $R_m = 0.1$ の成分が増加した (Fig. 9)。この成分は未変性 β -Cgy の R_m と一致し、さらに、二次構造、三次構造、四次構造も復元していることが明らかになった。単量体が塩添加により元の三量体を復元した事実は、解離したサブユニットの内部構造があまり破壊されておらず、native 状態に近いことを示唆している。

第V章 加熱変性 β -コングリシニンの構造研究

本章では種々の分光学的手段を用いて、 β -Cgyの熱変性状態を構造レベルから解析した。まず、 β -Cgyの各温度における分子形の変化を固有粘度 ($[\eta]$) を測定して検討した (Fig.10)。溶媒が水の場合は、溶質分子の荷電効果が原因して大きい値となるがこの値は真の分子形を表示していない (Fig.10, カーブ1)。0.01 M NaCl を添加して荷電効果を除去したところ、 $[\eta] = 10$ の値が得られた。また、予想に反して β -Cgyの固有粘度は75℃まで殆んど変わらず、0.01 M NaCl の系では90℃でも $[\eta] = 12.5$ を示すにすぎず、ランダムコイル ($[\eta] = 47.5$) と比べるとかなり低い値に留まった。固有粘度から予想される熱変性状態は、アンホールディングの程度は部分的なもので、極端に進行していないと結論された。

しかし溶媒中に十分量の塩 ($I = 0.5$) が存在すると、80℃以上で $[\eta]$ が急上昇した (Fig. 10, カーブ3)。これは、加熱で解離したサブユニット分子が周辺に十分な塩が存在するイオン雰囲気の中で、容易に会合し合い、高分子量の凝集体を形成した結果であると解釈された。

CDスペクトルの結果は二次構造的に秩序構造が保持されていることを示していた。

次に、 β -Cgyの側鎖の状態をチロシンの挙動から追求した。 β -Cgyに含まれる29コのTyrは、差スペクトルと分光滴定により、 β -Cgy分子上での分布をTable 1のように特定することができた。 β -Cgyの分子内部に含まれる17コのTyr残基が、加熱によって露出される状況をFig. 7の曲線から解析した。その結果、(A) 高温下で露出されるが、冷却でリホールドするTyr, (B) 高温下でも露出しないTyr, (C) 加熱で露出するが冷却後に復元せず、サブユニット接触域から露出したと考えられるTyr, の三つのグループに分類することができた (Fig.11)。87℃ではサブユニット内部に存在する9コのTyrのうち70%に相当する6コの残基を露出することから、 β -Cgyの側鎖構造は大きく崩れていると推定された。

以上の知見に基づいて、 β -Cgyの熱変性状態は、高温下では側鎖構造をかなり崩壊するが、主鎖部分には秩序構造を残していることから、不完全変性状態であると考えられた。冷却により崩壊していた側鎖構造は可逆的にリホールドすることから、加熱後冷却した分子は未変性構造に近い状態まで巻き戻ると推察された。

第VI章 β -コングリシニンの脂肪酸塩による変性について

前章までの研究により、 β -Cgyの熱変性状態はこれまで考えられていたよりも秩序構造を多く残した不完全変性状態であると予想された。この不完全変性状態が大豆タンパク質の食品機能性を制限している理由の一つに考えられた。そこで本章では、熱エネルギーとは異なり、タンパク質の疎水領域に親和性を示すことが期待される脂肪酸塩をとりあげて相互作用を検討した。

炭素鎖長 C_8 と C_{10} の脂肪酸塩の β -Cgyに対する結合等温線は、Langmuir 結合と協同結合の二つの領域からできていた (Fig.12-下図)。 C_{10} -Naの β -Cgyへの結合は、サイト数3コ、

結合定数 660 M^{-1} と弱いものであった。リガンドの結合に伴う β -Cgy の構造変化を追求した。 $[\theta]_{222}$ から測定した変性曲線 (Fig.12-上図) は二次構造変化が結合等温線とほぼ完全に一致することを示していた。Langmuir 結合領域では分子構造に変化が認められないが、結合数が30以上になるとタンパク質分子に小さな構造変化が認められるようになった。

脂肪酸塩で処理した大豆タンパク質 (APP) 溶液を凍結し、ゲル化を生ずるか否かを調べた。未加熱溶液 (APP) と 100°C 5 分加熱処理した APP 溶液を用いて検討した結果、 $0.1 \text{ M} \sim 1.0 \text{ M}$ の C_8 、 0.1 M 付近の C_8 、 0.01 M 付近の C_{10} 、の限定された濃度域でのみ、ゲル化を生じた (Fig.13 と Fig.14)。この結果は大豆タンパク質の物性発現に至適構造状態が存在することを示した例として注目される。

第Ⅶ章 β -コングリシニンの分子構造と食品機能発現について

これまで、大豆タンパク質 (主として β -Cgy) の熱変性状態について検討し、分子構造に関して一定の見解を示すことができた。また、脂肪酸塩で処理した場合の分子構造と食品機能発現との相関について知見を得ることができた。本章では、本研究で明らかにされた新知見に基づいて分子構造と物性発現との関係について言及したい。

(1) β -コングリシニンの加熱凝集体とゲル化との関係について

第Ⅱ章で溶液のイオン強度を操作するだけで、Fig.3 に示すような様々な程度に変性した β -Cgy 溶液を調製できることを報告した。これらのタンパク質分子がゲル化とどのように関連するかについて検討した。まず、ゲル化により加熱生成物 (解離体、凝集体、未変性分子) の組成を解析した (Fig.15)。イオン強度の増加に伴って解離したサブユニットが会合し、次第に高分子量の凝集体を形成する状態が三次元グラフ上に明確に表現されていた。次に、粗 7 S 試料を用いて、凍結によるゲル形成を追求した。Fig.16 の不溶化曲線が示しているように、ゲル化は高分子量の凝集体を含む試料液から生じることが明らかになった。従って、大豆タンパク質をゲル化させるには加熱変性時に凝集反応を起すことが重要であり、適度に会合した凝集体 (strands) ができ上っていれば、保水性の高いゲルネットワークが形成されると結論された。

(2) Ca 凝集ゲルへの応用

大豆タンパク質の最も一般的な利用形態は Ca で凝固した豆腐の形をとることが多い。豆腐や凍豆腐の製造法には経験的に知られているいくつかの厳守しなければならない操作条件がある。豆乳濃度や凝固温度などがそれであるが、これらの点に関しても、分子構造との関連から考察を試みた。

総 括

加熱によって生じる濁度が原因し、これまで不明であった大豆タンパク質の変性状態を、 β -Cgy の加熱変性機構の解析を通して分子構造レベルから解析することができ、以下のような新知見を得た。

β -Cgy の溶液系から塩類を完全に除去すると、中性付近で 100 °C の加熱を行なっても全く濁らないことを見出した。三量体から成る β -Cgy の四次構造は加熱で破壊され、定量的にサブユニットを解離した。この解離反応をチロシンの露出を指標として直接に分光学的に観察し変性曲線を得た。加熱変性 β -Cgy 分子の構造を解析し、熱変性状態はランダムコイル状ではなく、不完全変性状態であることを明らかにした。

β -Cgy の分子構造と物性発現との関係を追求し、加熱処理した β -Cgy 溶液がゲル化するには加熱で形成された解離体が凝集し、適度な大きさの strands に成長している必要があることを明らかにした。

β -Cgy の加熱変性を研究する中から、タンパク質の構造を加熱で変換させるには限界があり、特に、疎水領域の改変を期待できないことが類推された。この点を補う目的で脂肪酸塩と β -Cgy の相互作用を検討した。得られた構造上の知見とゲル化発現との関係を追求し、 β -Cgy の疎水領域を適度にゆらいだ状態 (ID_F) にすることが至適条件であることを明らかにした。この ID_F 状態は加熱では作り出せない種類のものと推定された。 ID_F 状態の β -Cgy 分子はゲル化の前段階として strands を形成する必要がなく、 β -Cgy 分子を単位として直接的にゲルネットワークを形成するコースをとり、加熱ゲル化とは機構を異にする新たなメカニズムであることを提案した。

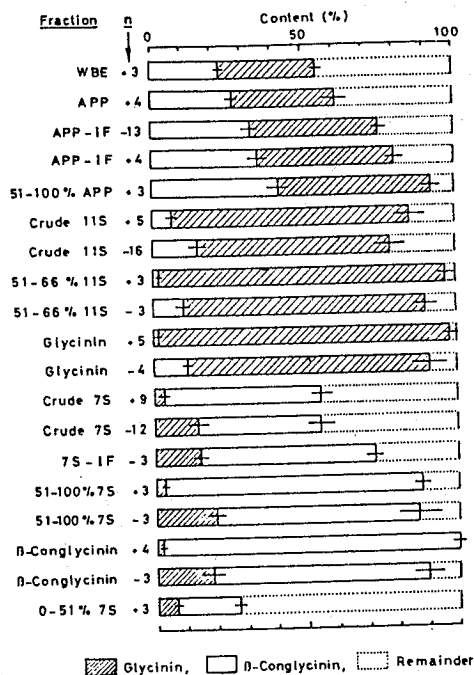


Fig. 1. Glycinin and B-Conglycinin Contents of Soybean Protein Fractions. Contents of the protein component were expressed in % of total protein. Remainder was determined by total protein minus glycinin and B-conglycinin content. Number of determinations was shown by n; +n corresponded to the preparations in the presence of 10mM 2-ME; -n corresponded to those in the absence of 2-ME. The horizontal line indicated standard deviation.

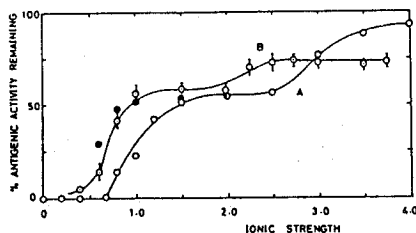


Fig. 2. Effect of Ionic Strength on Thermal Denaturation of 11S Globulins Heated at 100°C for 5 min. Percent antigenic activities; remaining in 11S globulin dissolved in K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (A) \circ - \circ , KCl solvent (B) \circ - \circ , and in NaCl solvent (\bullet). Analysis was quantitatively accurate within the $\pm 10\%$ level in each of the 3 lots of solutions.

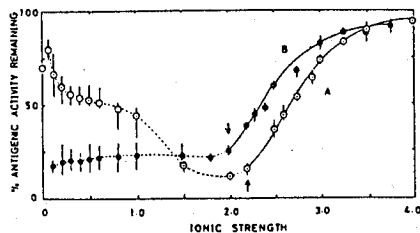


Fig. 3. Effect of Ionic Strength on the Thermal Denaturation of 7S Globulins Heated at 100°C for 5 min. Percent antigenic activity refers to the amount of undenatured 7S globulin remaining in the K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (A) and KCl solution (B).

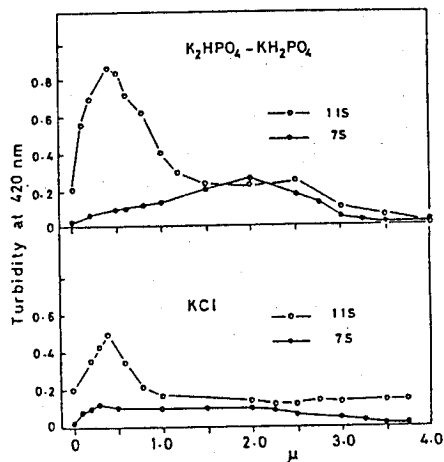


Fig. 4. Turbidity developed by heating (100°C, 5 min.)

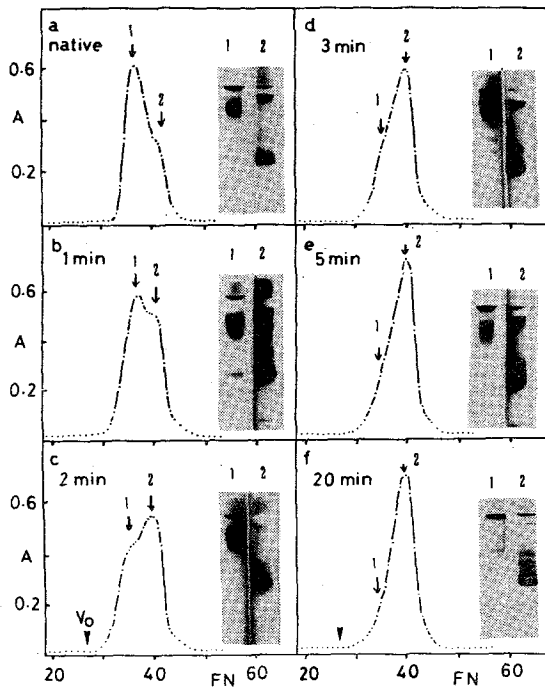


Fig. 5. Chromatography of B-conglycinins Heat-Treated at 65°C on a Column of Sepharose CI-6B (1x110cm) and PAGE patterns. Approx. 20 mg of materials was applied. Elution profiles are shown for native B-conglycinin dissolved in water (a), and heated B-conglycinins for 1 (b), 2 (c), 3 (d), 5 (e), and 20 min (f) in distilled water. These profiles were eluted with phosphate buffer, I=0.01, pH 7.6, at 4°C. The labeled peaks refer to undissociated B-conglycinin (1) and dissociated subunits (2).

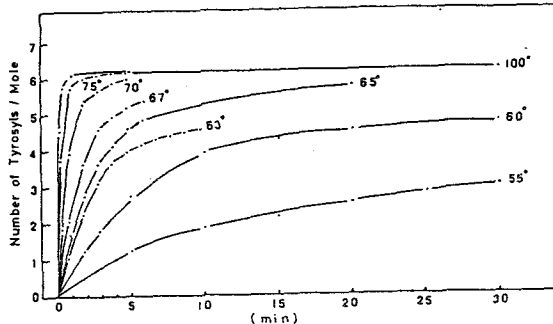


Fig. 6. Typical Plots of Dissociation versus Time of Heating of B-conglycinin at Various Temperatures of Heating. The reaction was followed by the increase in ΔA at 287 nm. The rate was measured periodically using the sample solution after cooling.

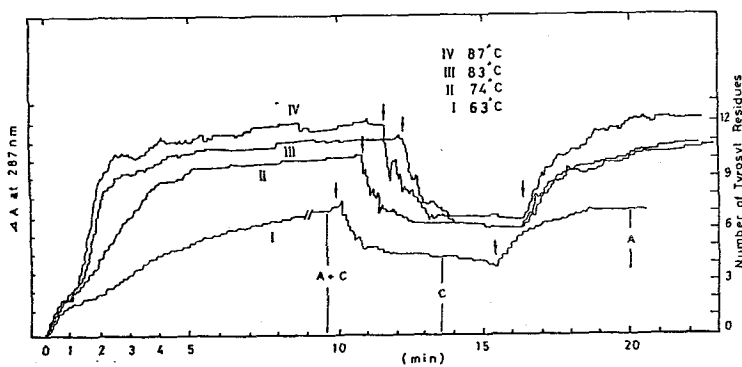


Fig. 7. Effect of Temperatures on Rate of Dissociation of B-conglycinin in Water. The reaction was followed by the increase in ΔA at 287 nm. The rate was measured continuously at the temperature of heating. Protein solutions were heated for 10-15 min until reaching equilibrium and then cooled by circulating water (15°C) and then reheated. The arrow shows the time where the first step "stops" and the second step "starts".

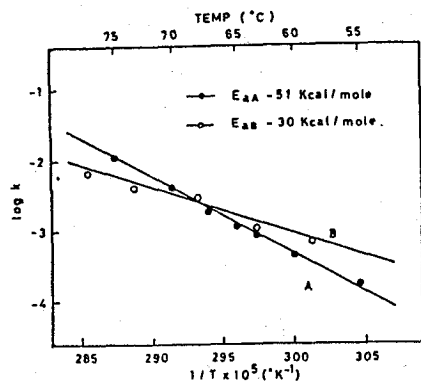


Fig. 8. Plots using the Arrhenius Relation: $\log k$ versus $1/T$: Slope = $-E_a / R \times 2.303$. Curves A and B show the plots of $\log k$ for dissociation of β -conglycinin by heating according to system A, and system B, respectively.

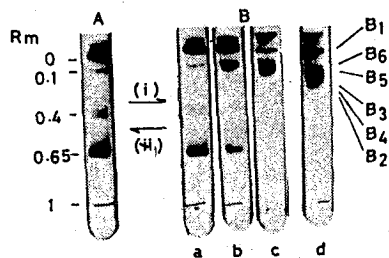


Fig. 9. Ornstein-Davis Disc Gel Electrophoresis of Heat-denatured β -Conglycinin and Reconstituted Products.

(A), salt-free heat denatured β -conglycinin; (B), reconstituted products. NaCl was added to the protein solutions at the following ionic strengths: 0.01, (a); 0.05, (b); and 0.1, (c). (d) is the unheated- β -conglycinin (control) dissolved in the standard buffer. Reactions between salt addition (i) and desalting (ii) were reversible.

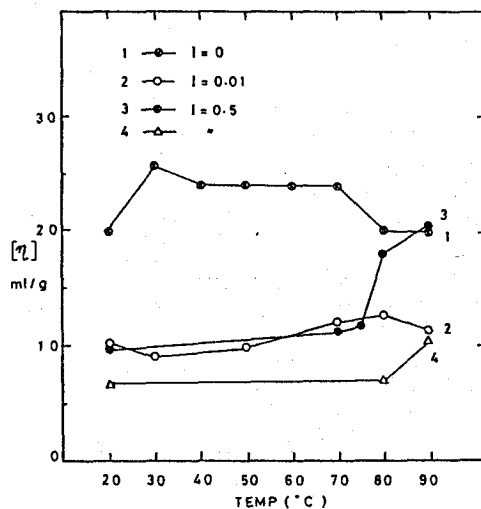


Fig. 10. Intrinsic Viscosity for β -conglycinin and glycine as a function of temperature under various conditions: β -conglycinin solutions in (1) distilled water, (2) 0.01 M NaCl, (3) 'phosphate buffer' (pH 7.6, $I=0.5$), and (4) glycine dissolved in phosphate buffer (pH 7.6, $I=0.5$).

TABLE I

ACCESSIBILITY TO THE SOLVENT OF TYROSINE RESIDUES OF β -CONGLYCININ AS MEASURED BY VARIOUS TREATMENTS

Treatment	Molar absorptivity difference at 287 nm, $\Delta \epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Number of Tyrosine residues*
β -Conglycinin in 5 M GuHCl	-12180	17.4
β -Conglycinin in 6 M urea	-10125	14.4
Salt-free heat denaturated β -conglycinin (100°C, 5 min)	-5625	8.0
Native β -conglycinin dissolved in distilled water (pH 7.5)	-1350	1.9

Location	Number of tyrosine residues
Surface	12 ^a
Area of contact between subunit	8 ^b
Interior of subunit	9 ^c

a) present on the protein surface in the native state in the presence of salt ($I = 0.5$, pH 7.6). This is obtained by calculation of the total number of tyrosyls minus the GuHCl exposed residues and agrees closely with those obtained by the titration curve.

b) present in the subunit contact regions, exposed by heating under salt-free conditions.

c) buried in the interior of the subunits, exposed by 5 M GuHCl. These 9 tyrosyls were further classified into three types according to titration behavior.

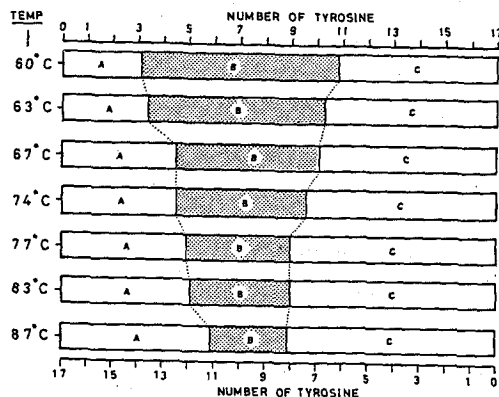


Fig. 11. Distribution of 17 Tyrosyl Residues Present in the Interior and the Subunit Contact Regions of β -Conglycinin under the High Temperature. A shows the number of tyrosine which is exposed by heating and able to refold reversibly by cooling. B shows the number of tyrosine which remains in the interior of the denatured β -conglycinin even at the high temperature. C shows the number of tyrosine which is present in the subunit contact regions.

A+C: determined from the ΔA of Fig. 7.

C: determined from the ΔA of Fig. 7.

A: calculated from $(A+C)-C$.

B: calculated from $17-(A+C)$.

A+B+C: 17 residues present in the native β -conglycinin.

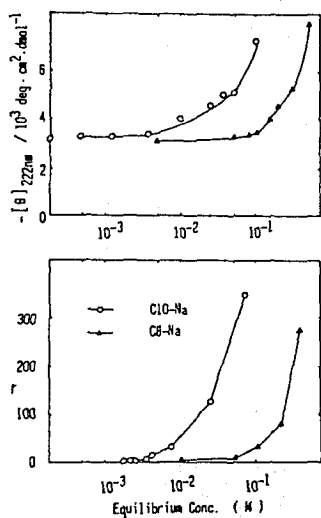


Fig.12. Comparison of Denaturation Curves with Binding Isotherms.

Upper: Denaturation curves were determined by $[\theta]_{222}$ of β -conglycinin depending on the concentrations of C_8 -Na (\bullet) and C_{10} -Na (\circ).

Lower: Binding isotherms of β -conglycinin to C_8 -Na and C_{10} -Na.

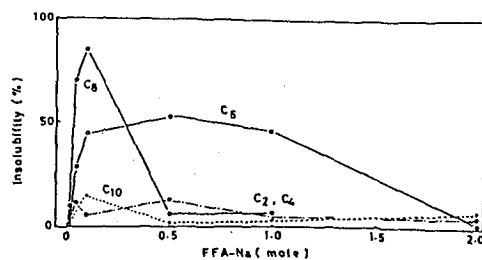


Fig.13. Effect of Various FFA on Freeze-Induced Gelation of Unheated APP (5%).

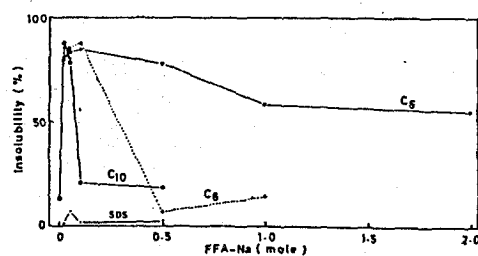


Fig.14. Effect of Various FFA on Freeze-Induced Gelation of Heat-Treated Soybean Protein (5%APP).

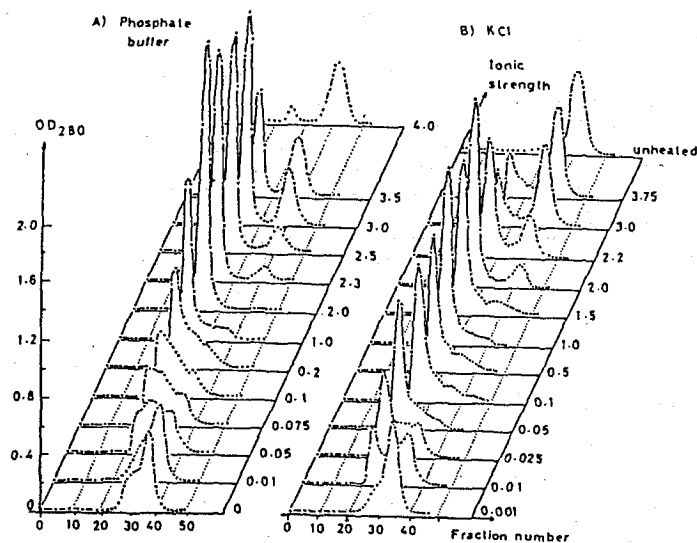


Fig.15. Thermal dissociation-association behavior of β -conglycinin

Sephacrose CL-6B (1 x 110 cm)
20 mg / 4 ml of salt solution
heating: 100°C, 5 min

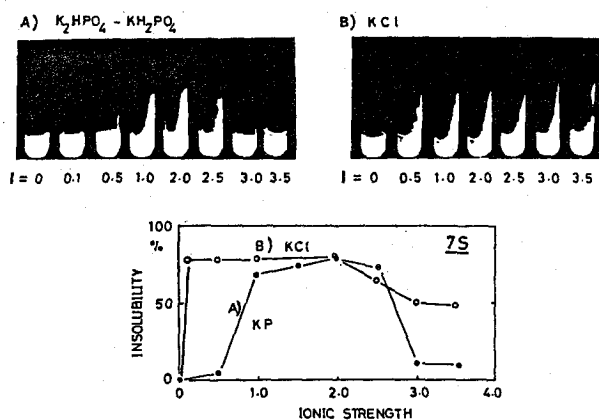


Fig.16. Freeze-Induced Gelation of Thermally Denatured 7S. Protein sample of crude 7S (5%) was dissolved in the salt solutions with various ionic strengths and heated at $100^{\circ}C$ for 5 min. These protein samples were dialyzed against water for 24-36 hr. and then frozen at $-20^{\circ}C$, followed by storage at $-5^{\circ}C$ for 2 days.

Upper: Photographs showing the freeze-induced gelation.
Lower: Degree of gelation was expressed as insolubility.

審 査 結 果 の 要 旨

食品タンパク質の機能発現を分子構造に関連づける試みは多くの期待にもかかわらず、極く一部のタンパク質で行なわれているにすぎない。その大きな理由の一つは、加熱により白濁してしまうため構造解析手段が限定され、熱変性状態の解析が遅れている点あげられる。本研究では大豆タンパク質の熱変性研究に分光学的手段の導入を目的として、 β -コングリシニンの解離会合反応を検討する中から加熱後も濁らない条件を見出すことに成功し、これまで不明であった β -コングリシニンの熱変性状態を明らかにすると共に、ゲル化発現との関係について新しい考え方を提出した。

β -コングリシニンは溶液からイオン強度を取り除いた蒸留水(pH7.0-8.0)中では100℃長時間加熱後も濁らなかった。この特性を利用し分子内部に埋没しているチロシンの挙動を追跡した。その結果、 β -コングリシニンの加熱変性曲線の作成に成功し、加熱変性を速度論的に解析できた。

著者はさらに、加熱解離体の分子構造について分光学的手法および流体力学的諸特性の測定により解析した。その結果、解離体の側鎖構造は高温下でその70%まで崩壊するが、この部分は冷却後可逆的にリホールドすること、また主鎖部分は高温下でも秩序構造を残した状態であることを明らかにし、これまでに考えられていたようなランダムコイル状ではなく、不完全変性状態であることを明らかにした。このように大豆タンパク質の熱変性状態を特定したのは本研究が最初である。

このような不完全変性状態にある β -コングリシニンからゲル化を発現させるには、溶液のイオン強度を上げて単量体の凝集化を促し適度な大きさのstrandを形成することが必要であることを明らかにした。

さらに、熱エネルギーがタンパク質の疎水領域を改変させるかが弱いことから疎水領域に親和性を示す脂肪酸塩をとり上げ、 β -コングリシニンとの相互作用を解析した。その結果、分子表面付近の疎水領域をゆらいだ状態にすることがゲル化発現に適していることを明らかにできた。

以上、本論文はいくつかの新しい知見を含み、食品タンパク質の分野に寄与するところ多大である。よって、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。